



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JÉSSICA DICK

**PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES p.R506Q (FVL) E c.G20210A (PT) EM PACIENTES COM
DOENÇA DE FABRY E DOENÇA DE GAUCHER ACOMPANHADOS NO SERVIÇO DE GENÉTICA
MÉDICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

Porto Alegre

Novembro/2014

JÉSSICA DICK

**PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES p.R506Q (FVL) E c.G20210A (PT) EM PACIENTES COM
DOENÇA DE FABRY E DOENÇA DE GAUCHER ACOMPANHADOS NO SERVIÇO DE GENÉTICA
MÉDICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da
Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profª Drª Ida Vanessa Doederlein Schwartz, MD, PhD.

Coorientadora: Profª Drª Sandra Leistner Segal, PhD.

Porto Alegre

Novembro/2014

“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela dádiva da vida e por iluminar meu caminho durante esta caminhada.

À minha orientadora Ida Vanessa Doederlein Schwartz, agradeço pela confiança e orientação conduzida sempre de maneira respeitosa e agradável; e por me apresentar o caminho da ciência baseado na dedicação e atualização contínua e, assim, se tornar um exemplo de pesquisadora e pessoa na qual me espelho.

À minha coorientadora Sandra Leistner Segal, agradeço pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela colaboração, paciência e seus conhecimentos repassados durante todo o estágio e desenvolvimento do trabalho. A vocês minha gratidão pelos valiosos ensinamentos e pela orientação que está proporcionando uma das maiores conquistas da minha vida acadêmica.

Ao Dr. Filippo, que muito me auxiliou na coleta de dados clínicos e me (re)passou dicas e informações importantes para construção desta monografia. À doutoranda Isabel Bandeira, agradeço pela incansável ajuda, pela grande amizade e pelos cafézinhos.

A todos os demais colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular (LGM): Aline, Ana Carolina, Francyne, Rose, Fabiane, Rowena, Bruna. Agradeço por fazerem parte e alegrarem o dia-a-dia no laboratório, obrigada pelo apoio, pelas ideias e soluções e pelas risadas.

Agradeço também as grandes amizades conquistadas durante a graduação: Maria Eduarda, Giana, Igor, Andréia, Luana, Patrícia, Leonardo e Eduardo. Obrigado pela força durante a graduação e, principalmente, por me fazerem descobrir a amizade verdadeira, minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem vocês.

Ao meu namorado Jean, pelo incentivo e fundamental apoio dado durante os momentos mais difíceis. Obrigada pelo carinho, pela paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada semestre.

Agradeço de modo especial ao apoio incondicional da minha mãe Zuleica, guerreira incansável que lutou diariamente comigo nesses anos todos, desde minha decisão de ingressar na UFRGS, por ter me dado toda estrutura, segurança e amor que necessitei e por ter sempre acreditado no meu potencial, fazendo o possível e impossível para que esse sonho se concretizasse; ao meu pai, meu irmão, meus avós, meus tios, meus primos, que compreenderam minha ausência nas reuniões familiares durante períodos de intenso estudo.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

Essa conquista é NOSSA!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Cascata de Coagulação.....	11
1.1.1. Trombifilias.....	15
1.1.1.1. Mutação Fator V Leiden (R506Q).....	16
1.1.1.2. Mutação do gene da Protrombina (G20210A).....	16
1.2. Erros Inatos do Metabolismo.....	17
1.2.1. Doença de Fabry.....	18
1.2.2. Doença de Gaucher.....	19
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVO.....	24
3.1. Objetivos Gerais.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO – FABRY.....	25
5. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO – GAUCHER.....	34
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVA.....	47
7. REFERÊNCIAS ADICIONAIS.....	49
ANEXOS DO TRABALHO.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

α -GAL – **α galactosidase**

A – **Adenina**

AIT – **Ataque Isquêmico Transitório**

AC – **Angioqueratoma (*Angiocheratomi*)**

APC – **Proteína C Ativada (*Activated Protein C*)**

Arg – **Arginina**

AVC – **Acidente Vascular Cerebral**

AVN – **Necrose Avascular (*Avascular Necrosis*)**

BGA – **beta-glicosidase ácida**

CVA – **Acidente Vascular Cerebral (*Cerebrovascular Accident*)**

DF – **Doença de Fabry**

DG – **Doença de Gaucher**

DMH – **Doença Metabólica Hereditária**

EIM – **Erros Inatos do Metabolismo**

ERT – **Terapia de Reposição Enzimática (*Enzyme Replacement Therapy*)**

FVL – **Fator V de Leiden**

G – **Guanina**

GL – **Glicoesfingolipídios**

GL3 – **Globotriaosilceramida (*Globotriaosylceramide*)**

Glu – Glutamina

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

PGI2 – Prostaciclina ou Prostaglandina I2

TEV – Tromboembolismo Venoso

TIA – Ataque Isquêmico Transitório (*Transient Ischemic Attack*)

VTE – Tromboembolismo Venoso (*Venous Thromboembolism*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da Cascata de Coagulação (Via Extrínseca, Via Intrínseca e Via Comum).....	13
Figura 2. Trombina e as vias pró-coagulante e anticoagulante.....	17
Figura 3. Ilustração demonstrando o acúmulo de GL, não digeridos pela enzima α -GAL dentro do lisossomo da célula de pacientes com Doença de Fabry.....	19
Figura 4: A doença de Gaucher possui hereditariedade autossômica recessiva, que acomete igualmente ambos os sexos.....	20

RESUMO

A trombose é reconhecidamente uma doença de caráter multifatorial e sua ocorrência está relacionada à presença de fatores genéticos e/ou adquiridos. Um risco herdado de trombose, incluindo a variante do fator V – Fator V de Leiden (FVL) – e da protrombina, podem predispor à necrose avascular (AVN) em pacientes com doença de Gaucher (DG) ou a outros eventos tromboembólicos em indivíduos com a doença de Fabry (DF). Como não existem exames laboratoriais ou marcadores clínicos úteis para prever quais pacientes com estas doenças lisossomais podem desenvolver tromboembolismo, o presente estudo foi realizado para verificar se existe uma predisposição hereditária à hipercoagulabilidade em pacientes com estas doenças e que possa estar associada a desfechos clínicos. A análise foi realizada por PCR em tempo real, com DNA genômico extraído de 39 pacientes com a DF e de 42 pacientes adultos com DG. Ao unirmos estes dois grupos de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a frequência da variante no gene da protrombina foi de 2,47% e do fator V Leiden foi de 6,17%. Analisando esses fatores genéticos de predisposição à trombofilia, não encontramos aumento da frequência em pacientes com DG e DF com eventos tromboembólicos, embora quando comparadas as prevalências dessas variantes com a população geral. Estudos em coortes maiores e, possivelmente, a inclusão de fatores adicionais podem ser necessários para determinar se existe de fato alguma correlação.

INTRODUÇÃO

1.1. Cascata de Coagulação

O aparelho circulatório humano constitui-se de um sistema de tubos fechados, que impede que o sangue extravase para banhar diretamente os tecidos. Os fatores vasculares e sanguíneos devem estar em equilíbrio, permitindo que o sangue permaneça líquido no interior dos vasos. O rompimento desse equilíbrio, qualquer que seja a natureza, poderá levar, além de um extravasamento sanguíneo, a uma alteração de fluidez, tornando o sangue um gel, dificultando ou impedindo a circulação no local de sua formação, devido à massa sólida de sangue formada, chamada trombo. A formação do trombo ou a perda do sangue (hemorragia) terão consequências variadas, dependendo do local atingido. A intensidade de ambas (hemorragia ou trombose) vai depender do tamanho das alterações e do grau do desequilíbrio atingido (Verrastro, 1999).

O endotélio tem como função impedir a coagulação, (1) por servir como barreira mecânica ao tecido conjuntivo subendotelial, que é altamente trombogênico e que contém o fator tecidual, e (2) por produzir vários fatores que (a) inibem a agregação das plaquetas, (b) bloqueiam o sistema da coagulação, e (c) favorecem a dissolução dos coágulos. O coágulo é removido principalmente pela enzima plasmina, formada pela ativação da pró-enzima plasmática plasminogênio e pelos ativadores do plasminogênio produzidos pelo endotélio (Carneiro & Junqueira, 1999).

As células endoteliais modulam vários aspectos, frequentemente opostos, da hemostasia normal – o endotélio intacto impede que as plaquetas e fatores de coagulação entrem em contato com a matriz extracelular subendotelial, que é altamente trombogênica. Se por um lado, normalmente possuem propriedades antiplaquetárias, anticoagulantes ou fibrinolíticas, através de prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico – potentes vasodilatadores e inibidores de agregação plaquetária; por outro, após uma lesão ou ativação, são capazes de exercer funções pró-coagulantes. O equilíbrio entre as atividades endoteliais antitrombótica e pró-trombótica determina criticamente se ocorrerá formação, propagação ou dissolução do trombo (Contran, 2000).

A lesão de um vaso sanguíneo desencadeia três importantes mecanismos para controlar a perda de sangue. Inicialmente, há a contração do músculo liso da parede do vaso lesionado. Posteriormente, ocorre a aderência das plaquetas circulantes ao sítio da lesão (adesão plaquetária) e posterior adesão de outras plaquetas às já aderidas ao sítio de lesão (agregação plaquetária), fenômenos que dão origem ao tampão plaquetário. Finalmente, a coagulação do sangue, que permite, mediante uma rede de fibrina, a consolidação do tampão plaquetário com formação de tampão hemostático (Bozzini, 2004).

A formação do coágulo de fibrina envolve complexas interações nas quais o sangue perde suas características de fluido, sendo convertido em massa semi-sólida, formando um coágulo irreversível, pela interação do tecido lesado, plaquetas e fibrina. O mecanismo bioquímico da formação do coágulo sanguíneo envolve uma sequência de interações proteína-proteína (Swenson, 1996). Consiste na conversão de uma proteína solúvel do plasma, o fibrinogênio em fibrina, por ação de uma enzima denominada trombina (Bozzini, 2004). É uma série de etapas de ativação, sequenciais, onde o substrato para cada enzima (ou complexo enzimático) é uma pró-enzima que é ativada para atuar na próxima etapa da reação, sequência de reações denominada “cascata” (Guyton & Hall, 2002).

Existem dois mecanismos relacionados intimamente que, quando estimulados, podem gerar fibrina. O mecanismo intrínseco refere-se à sequência de reações enzimáticas que se inicia quando o sangue entra em contato com a superfície lesada. O mecanismo extrínseco refere-se à sequência de reações que ocorrem quando a lesão de um vaso sanguíneo resultando na liberação de extratos teciduais. (Swenson, 1996). Estas duas vias convergem para a ativação do fator X na via comum, levando, à formação de fibrina.

As proteínas plasmáticas da cascata de coagulação recebem o nome de fatores de coagulação e são designados, em sua maioria, por algarismos romanos. Para indicar sua forma ativada, acrescenta-se a letra “a” minúscula após o algarismo. O número correspondente a cada fator foi designado por ordem que foram descobertos e não reflete a sequência das reações. Os fatores da coagulação podem ser agrupados da seguinte maneira: a) fatores que se modificam durante a coagulação (fatores I, V, VIII e XIII); b) fatores do grupo da protrombina (fatores II, VII, IX e X); c) fatores do grupo de contato (fatores XI e XII) (Guyton & Hall, 2002).

VIA EXTRÍNSECA

A via extrínseca (Figura 1A) é o meio pelo qual a substância ativadora da protrombina é gerada em resposta ao contato do sangue com os tecidos extravasculares. Ocorre quando a ativação do fator VII, pelo fator tecidual, produz a ativação do fator X (Bozzini, 2004). O tecido traumatizado libera um complexo de vários fatores, denominado fator tecidual ou tromboplastina tecidual. A tromboplastina (também conhecida como fator III) desencadeia o mecanismo de coagulação da via extrínseca, com o fator VII, um complexo estequiometricamente dependente do cálcio. O fator VII é transformado em uma enzima ativa (fator VIIa), que atua sobre o fator X, gerando o fator Xa, dando início a via comum (Guyton & Hall, 2002).

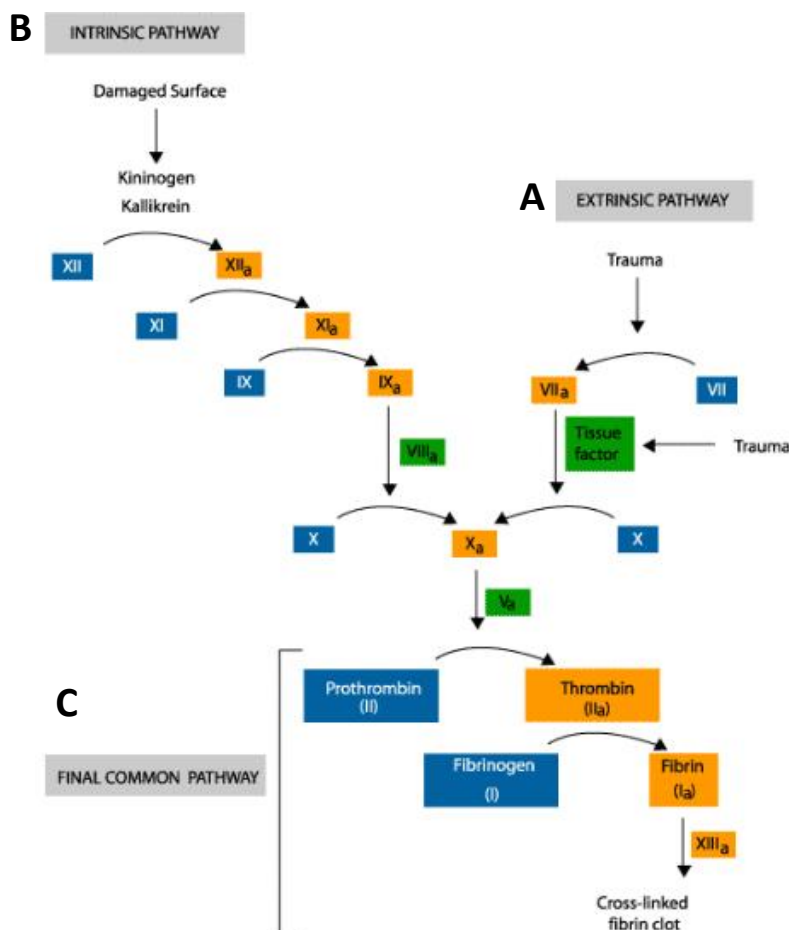


Figura 1. Cascata de Coagulação (Fonte: Anaesthesia UK (Coagulation- classical model))

VIA INTRÍNSECA

A via intrínseca (Figura 1B) inicia-se pelo contato do sangue com uma superfície diferente do endotélio normal e das células sanguíneas (Bozzini, 2004). A sequência de reações enzimáticas produz o coágulo sanguíneo nas diferentes etapas: (a) fase de contato; (b) a ativação do fator X; (c) a formação de trombina; (d) a formação de fibrina insolúvel (Swenson, 1996).

A fase de contato envolve quatro proteínas: fator XII, pré-caliceína, fator XI e cininogênio de alto peso molecular (CAPM). Na presença de CAPM, o fator XI adere à superfície exposta e é ativado pelo fator XIIa ligado à superfície (Swenson, 1996). As perturbações do sangue fazem com que o fator XII converta-se em uma enzima proteolítica (fator XIIa). A caliceína e o cininogênio de alto peso podem modular a ativação do fator XII. Esta lesão resulta na liberação de fosfolipídios plaquetários ou fator 3 plaquetário (FP3) (Franco, 2001).

O fator XII ativado atua enzimaticamente sobre o fator XI para ativá-lo, constituindo a segunda etapa da via intrínseca. O fator XI atua sobre o fator IX ativando enzimaticamente. Por sua vez, o fator IXa, ao atuar com o fator VIIIa, fosfolipídios plaquetários e com o FP3, ativa o fator X (Guyton & Hall, 2002).

VIA COMUM

A via comum (Figura 1C) inicia com a ativação do fator X, pela combinação de várias substâncias: fator III, cálcio, fator VII e fosfolipídios teciduais na via extrínseca e, da mesma forma, o FP3, fator IX e o fator VII na via intrínseca (Franco, 2001).

O fator X ativado combina-se com os fosfolipídios teciduais ou com fosfolipídios liberados pelas plaquetas, bem como fator V para formar o complexo denominado ativador de protrombina (Guyton & Hall, 2002). A substância ativadora de protrombina inicia a ativação do fator II (protrombina) em fator IIa (trombina), onde a principal ação da trombina é a conversão do fibrinogênio (fator I) em monômeros de fibrina, que são interligados pelo fator XIII ativado, formando polímeros insolúveis de fibrina. A transformação ou “estabilização” da fibrina solúvel em um coágulo de fibrina insolúvel é catalisada pelo fator XIII, na presença de cálcio, onde o fator XIII normalmente circula no plasma sob a forma de proenzima inativa e é convertido em sua forma ativa pela trombina (Swenson, 1996).

Tão importante quanto a formação do coágulo de fibrina, que bloqueia a perda de sangue e repara a parede vascular lesada, é a remoção do coágulo sanguíneo, para que prossiga a circulação sanguínea normal. A remoção do coágulo depende de dois processos, a retração do coágulo e a degradação da fibrina insolúvel (fibrinólise) – dividida em duas fases: geração de plasmina, a partir do plasminogênio, e a ação proteolítica da plasmina sobre a fibrina. Esses processos dependem da interação entre as plaquetas e as proteínas plasmáticas (Swenson, 1996).

1.1.1. Trombofilia

A predisposição ao tromboembolismo (oclusão de vaso sanguíneo por coágulos, também chamados de trombos) devido à presença de fatores genéticos ou adquiridos é denominada trombofilia (Rodak, 2002). A trombose é uma doença de caráter multifatorial, e tanto fatores de risco genéticos quanto adquiridos (uso de anticoncepcional oral, gravidez, imobilização pós-cirúrgicas, traumatismo ou doenças malignas), podem estar presentes em um mesmo indivíduo, sendo o tromboembolismo resultante da interação sinérgica ou não entre esses fatores (Franco, 2001).

Pacientes com trombofilia hereditária exibem uma predisposição à trombose recorrente e, o evento trombótico ocorre, em geral, antes dos 45 anos de idade. As doenças tromboembólicas são uma das causas mais comuns de morbidade, incapacitação e mortalidade, com incidência na população geral de um caso para cada mil indivíduos por ano (Poort, 1996; Milani, 2008).

Em contraste com as doenças monogênicas, onde mutações em um único gene resultam na doença, em doenças multifatoriais, como a trombose venosa, diferentes mutações em genes distintos interagem para ocasionar o evento. Desta forma, a predisposição à trombose venosa associada com cada alteração genética isolada é relativamente baixa, porém a presença de mutações em vários genes aumenta significativamente o risco de desenvolvimento da doença (Franco, 2001).

Os fatores genéticos envolvidos no estudo consistem em duas mutações em diferentes genes que codificam fatores hemostáticos, podendo ocorrer isoladas ou

combinadas entre si: (1) resistência à ação da proteína C ativada (Fator V de Leiden) e (2) mutação do gene do Fator II (Protrombina).

1.1.1.1. Mutação Fator V Leiden (p.R506Q)

O fator V é uma glicoproteína de 330 kDa que, quando ativada, potencializa a conversão da protrombina em trombina. Sua atividade pró-coagulante é inibida por meio da clivagem pela proteína C ativada nas regiões Arg306, Arg506 e Arg679. A substituição da guanina pela adenina na posição 1.691 no éxon 10 do gene do fator V, no cromossomo 1, resultando na troca da Arginina (Arg) pela Glutamina (Gln) na posição 506 da proteína, é a mutação conhecida como fator V Leiden (Bertina, 2001; Norstrom, 2002). Tal alteração reduz substancialmente a inativação pela proteína C ativada, pois seu sítio de clivagem está alterado, elevando assim a geração de trombina e podendo desenvolver um estado de hipercoagulabilidade (Bertina, 2001).

Os portadores homozigotos para essa mutação (genótipo AA) apresentam risco 50 a 100 vezes maior de desenvolver trombose quando comparados aos não portadores de fator V de Leiden. Por sua vez, os heterozigotos para essa mutação (genótipo GA) apresentam esse risco na ordem de 5 a 10 vezes maior. O FVL é detectado em cerca de 3 a 5% da população caucasóide da Europa e Estados Unidos e em menos de 1% no sudeste da Ásia, Oriente Médio e África (Rees, 1995).

1.1.1.2. Mutação do Gene da Protrombina (p.G20210A)

A protrombina, ou fator II de coagulação, é uma proteína sanguínea sintetizada no fígado na presença de vitamina K. É precursora da trombina, que ao final da cascata de coagulação induz a formação de fibrina (Figura 2). Participando também dos mecanismos de controle de coagulação, ligando-se à trombomodulina e ativando o sistema da proteína C, tem papel fundamental no equilíbrio anticoagulante (Poort, 1996).

O gene responsável pela protrombina contém aproximadamente 21.000 pb, composto de 14 éxons e 13 íntrons, localizado próximo ao centrômero no cromossomo 11 (Zivelin, 1998). Essa variante alélica consiste em uma mutação pontual, em que ocorre a troca de uma guanina base nitrogenada por uma adenina na posição 20210 do gene da

protrombina. Essa mutação induz um ganho de função, aumentando a concentração plasmática da protrombina, o que predispõe à ocorrência de trombose, sendo encontrada em 1-3% da população geral, e em 6-18% do pacientes com tromboembolismo venoso (TEV) (Poort, 1996).

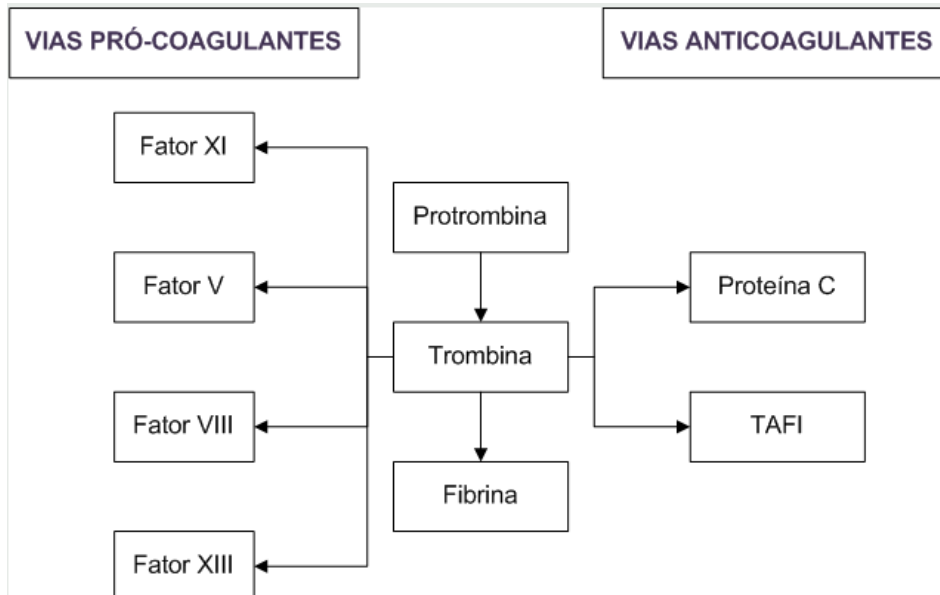


Figura 2: Trombina e as vias pró-coagulante e anticoagulante

*TAFI: inibidor da fibrinólise (degradação da fibrina) ativado por trombina, capaz de remover resíduos de lisina da molécula de fibrina durante o processo de lise do coágulo.

Pesquisas realizadas na população em geral mostraram frequência de 2% para o genótipo heterozigoto (Rosendaal, 1998). Esta mutação encontra-se com **maior** frequência na população caucasiana e ainda não foi encontrada em pacientes negros e asiáticos (Hira, 2003). No sul do Brasil, pesquisas em Santa Catarina e Paraná apresentaram frequências genotípicas para heterozigose de 15,13% e 7,26%, respectivamente (Herkenhoff, 2012).

1.2. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios de natureza genética que geralmente são causados por um defeito enzimático que acarreta na interrupção de alguma

via metabólica relacionada à falha de síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas no organismo (Araujo, 2004; Souza, 2002).

A incidência isolada de cada uma das doenças metabólicas é pequena, no entanto, se forem contabilizados os dados dos cerca de 700 distúrbios conhecidos (Sanseverino, 2000), a frequência se torna mais expressiva, de aproximadamente 1/1.000 nascidos vivos. A incidência e a prevalência destas doenças individualmente variam de acordo com a composição racial e étnica da população, além disso, deve-se considerar que os números baixos podem representar, não só a raridade dos distúrbios, como, também, a subestimação de seu diagnóstico (Prietsch, 2006).

Dentre os diversos EIMs, o estudo tem enfoque na Doença de Fabry (relacionada à deficiência da enzima α -galactosidase) e na Doença de Gaucher (deficiência da enzima beta-glicosidase ácida ou beta-glicocerebrosidase).

1.2.1. Doença de Fabry

A Doença de Anderson-Fabry, também conhecido como Doença de Fabry (DF) foi relatada de maneira independente e quase simultânea pelos dermatologistas William Anderson, na Inglaterra e Johannes Fabry, na Alemanha, em 1898 (Werninghaus, 1995). Trata-se de erro inato do metabolismo dos glicoesfingolipídios (GL), causado por mutações no gene que codifica a enzima lisossômica α -galactosidase A (α -GAL) (Branton, 2002).

O gene afetado na DF chama-se *GALA*, tem cerca de 12kb de tamanho e encontra-se no cromossomo X, na região Xq22 (Krawczak, 2000). Atualmente foram identificadas mais de 400 mutações, sendo que a maioria das famílias possui "mutações privadas", ou seja, mutações específicas para essa determinada família (Masson, 2004). Acreditava-se que a DF só afetava os homens e as mulheres eram portadoras assintomáticas, porém foi detectado que a enfermidade também pode aparecer por uma inativação aleatória do cromossomo X (Choudhury, 2005).

A redução ou ausência da atividade de α -GAL A leva ao acúmulo progressivo de GL neutros com resíduos terminais α -galactosil (sobretudo sob a forma de globotriasilceramida ou GL-3) no plasma e nos lisossomos (Figura 3), em particular no endotélio vascular,

produzindo protuberâncias no lúmen dos vasos que causam estreitamentos e dilatações, que progridem para isquemia e infarto, assim como também seu acúmulo em outros tipos de células leva a aumento do tamanho celular e disfunção visceral (Desnick, 2001), atingindo principalmente pele, rins, coração, olhos e cérebro (Branton, 2002; Larralde, 2004).

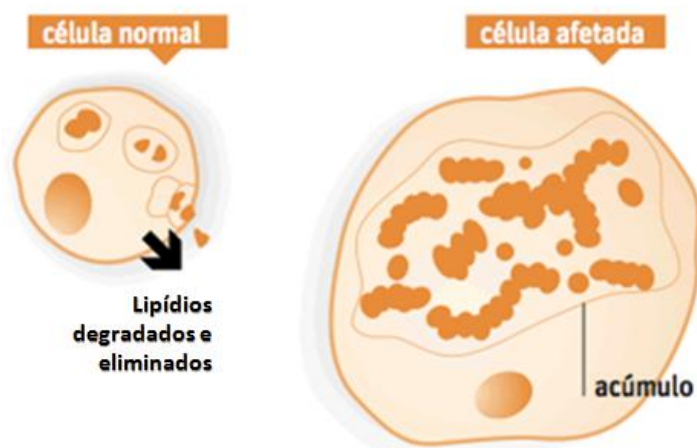


Figura 3: Ilustração demonstrando o acúmulo de GL, não degradados pela enzima α -GAL dentro do lisossomo da célula de pacientes com Doença de Fabry.

Em doentes do sexo masculino, hemizigotos, mutações em *GALA* tem alta penetrância, e a maioria apresenta o fenótipo clássico da doença (MacDermot, 2001; Wang, 2007). Os sintomas iniciam na infância ou na adolescência, com parestesias e episódios de dor acral e/ou abdominal (crises do Fabry), intolerância ao calor, diminuição ou ausência de sudorese, presença de angioqueratomas (AC) na pele e/ou mucosas e córnea verticilata. Entre a terceira e a quarta década de vida ocorre piora desses sintomas e há um comprometimento sistêmico progressivo com alterações cardíacas, renais e cerebrais (Larralde, 2004; Larralde, 2007). Na ausência de história familiar da doença, o diagnóstico geralmente é feito tardiamente (idade média de 29 anos), quando já se desenvolveu dano visceral irreversível (Larralde, 2004). Formas mais leves da doença, as quais se apresentam tardiamente com afecção primária dos sistemas renal ou cardiovascular, são conhecidas como formas atípicas da DF e ocorrem em doentes com atividade enzimática detectável (Nakao, 2003; Von Scheidt, 1991). Formas de gravidade intermediária encontram-se entre o fenótipo clássico e as formas atípicas (Whybra, 2001).

Em doentes do sexo feminino, heterozigotas, a doença tem expressividade variável por causa da inativação aleatória de um dos cromossomos X (hipótese de Lyon). Atualmente

as heterozigotas não são consideradas apenas portadoras, entretanto a apresentação clínica da doença nas mulheres pode ir do estado assintomático a quadro tão grave quanto ao que ocorre em homens (MacDermot, 2001; Wang, 2007; Whybra, 2001).

1.2.2. Doença de Gaucher

A Doença de Gaucher (DG) é um EIM do grupo das doenças lisossômicas, sendo a mais frequente do referido grupo (Scriver, 1996). É de herança autossômica recessiva, ou seja, com um risco de 25% a cada gestação de casal heterozigoto (Figura 4), podendo comprometer ambos os sexos (Martins, 1999).

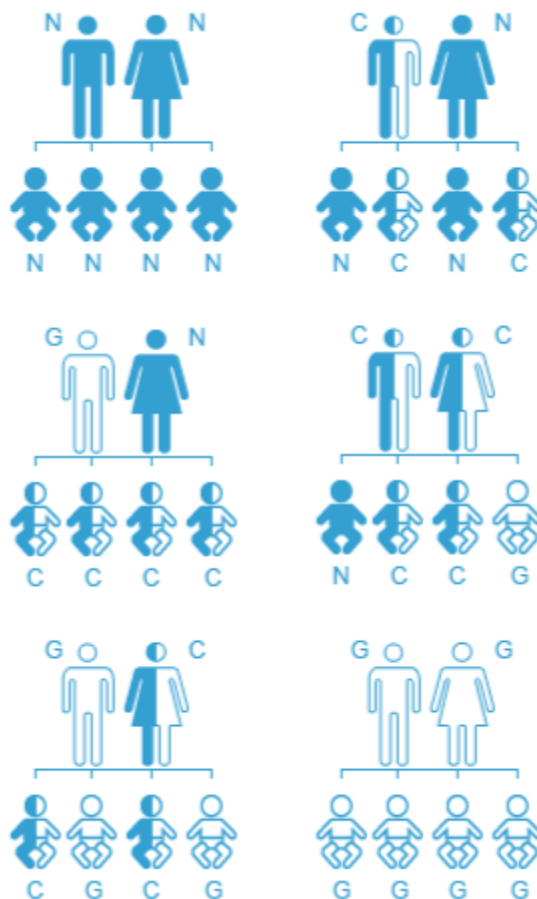


Figura 4: A doença de Gaucher possui hereditariedade autossômica recessiva, que acomete igualmente ambos os sexos. N=normal, C=portador, G=afetado.

A doença é resultante da deficiência enzimática de beta-glicosidase ácida (GBA) ou beta-glicocerebrosidase, o que leva ao excesso de glicolípidios nos macrófagos, que são denominados células de Gaucher. O acúmulo destas células leva a eventos fisiopatológicos com infiltração de massas de células de Gaucher em órgãos do sistema retículo-endotelial, com consequências secundárias, como hepatomegalia, esplenomegalia, trombocitopenia, anemia, doença esquelética, hipertensão pulmonar, doença pulmonar intersticial e – em uma minoria – envolvimento neurológico central (Cox, 2001).

As manifestações clínicas ou fenotípicas da DG dependem de diversos fatores, sendo a DG classificada em três tipos:

Tipo I: é a forma não neuropática que afeta adultos e crianças com hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia, leucopenia e lesões ósseas. O acúmulo de glicocerebrosídeo na medula óssea leva à osteopenia, lesões líticas, fraturas patológicas, dor óssea crônica, infarto e osteonecrose. A progressão geralmente é lenta ou variável, e a sobrevida pode ser normal dependendo da gravidade das complicações (Barranger, 2001; Charrow, 1998; Böhm, 2001). É o tipo mais frequente, correspondendo a 95% dos casos de DG (Altarescu, 2000);

Tipo II: a forma neuropática aguda afeta lactentes de 4 a 5 meses com quadro neurológico grave, convulsões, hipertonia, apneia, progressivo retardo mental. A evolução é rápida com morte nos dois primeiros anos de vida, geralmente causada pelo envolvimento pulmonar (Barranger, 2001; Grabowski, 1998);

Tipo III: a forma neuropática crônica que afeta crianças e adolescentes com um comprometimento de fígado, baço, ossos e, a evolução do quadro neurológico é variável, porém menos grave que o Tipo II. A sobrevida se dá até a segunda ou terceira década de vida (Barranger, 2001; Grabowski, 1998).

A osteonecrose ou necrose avascular (NAV) constitui a mais debilitante das manifestações da doença de Gaucher. À medida que as células de Gaucher se acumulam na medula óssea, elas podem restringir o fluxo normal do sangue e, assim, limitar o fornecimento de oxigênio e nutrientes para os ossos, alterando a estrutura do osso. A necrose avascular geralmente é subsequente a episódios de crise óssea localizada em determinada região, provocando dor aguda ou crônica, às vezes acompanhada de febre alta

e sinais inflamatórios. Pode ocorrer em qualquer idade, é mais comum em ossos longos, principalmente fêmur distal, tíbia proximal, úmero, seguido da espinha e pelve (Mendonça, 2001; Zimran, 2005).

Mais de 150 mutações no DNA, no cromossomo 1 (1q2.1) têm sido descritas, entretanto existem cinco alterações nucleotídeas comuns, que respondem pela maioria dos casos – p.N307S, p.L444P, p.84GG, IVS2+1, p.G377S. Embora não exista correlação entre o genótipo e o fenótipo, pelo menos é possível distinguir a forma neuropática da não neuropática, uma vez que a mutação c.1226G (p.N370S) está muito associada ao tipo I e a mutação c.1448C (p.L444P) ao tipo II da doença (Elstein, 2001; Grabowski, 2008).

O diagnóstico pode ser um desafio, apesar da disponibilidade de exames diagnósticos precisos e não invasivos, devido à raridade da doença, alguns médicos podem até mesmo não considerar realizar exames específicos para DG (Grabowski, 1995), sendo que o diagnóstico de certeza da DG é estabelecido por meio da dosagem da atividade da GBA. O tratamento é feito por terapia de reposição enzimática (TER) específica ou por terapia de redução do substrato (TRS) (Charrow, 2004). Além disso, existem terapias para redução da dor, transfusões sanguíneas, cirurgia ortopédica para ossos e articulações e, raramente, esplenectomia, uma vez que essa doença afeta várias partes do corpo.

2. JUSTIFICATIVA

A caracterização de fatores de risco para o tromboembolismo venoso (TEV) representa etapa fundamental na compreensão da patogênese desta entidade, que tem grande importância clínica devido à sua alta incidência em diversas populações: 1/1.000 indivíduos por ano, sendo responsável nos Estados Unidos por 50.000 óbitos/ano (Meijers, 2000). A população brasileira possui uma prevalência de caucasoides, logo possui também, uma incidência relevante de trombofilias hereditárias. Apesar disso no Brasil, dispomos de poucos dados na literatura especializada devido à descoberta destas trombofilias serem relativamente recentes – FVL em 1994 e mutação no gene de protrombina em 1996.

A investigação das mutações p.R506Q e p.G20210A fazem parte do screening dos pacientes com TEV, no Laboratório de Genética Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A análise para essas mutações em pacientes com doença de Fabry e de Gaucher é importante uma vez que estes indivíduos apresentam um estado pró-coagulante, que pode levar a ataques isquêmicos transitórios, derrames e necrose avascular de extremidades (Boggio, 2009; Martins, 1999; Charrow, 2004). A identificação destas trombofilias em pacientes com as doenças lisossomais em questão torna-se pertinente, uma vez que pode afetar a adoção de regimes profiláticos e terapêuticos mais agressivos quando houver a associação de mutações - lisossomais e trombofilicas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Analisar os pacientes com doença de Fabry e doença de Gaucher em acompanhamento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para alterações nos genes de Fator V e de Protrombina, e sua associação com eventos clínicos trombofílicos.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Determinar o genótipo no nucleotídeo 20210 do gene de protrombina e no nucleotídeo 1691 do gene de fator V, em pacientes com a Doença de Fabry, através de análise quantitativa por PCR em Tempo Real.

3.2.2. Determinar o genótipo no nucleotídeo 20210 do gene de protrombina e no nucleotídeo 1691 do gene de fator V, em pacientes com a Doença de Gaucher, através de análise quantitativa por PCR em Tempo Real:

3.2.3. Caracterizar a clínica dos pacientes através dos prontuários e relacionar com o genótipo das mutações avaliadas.

4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

Formatado para submissão na **Clinical & Biomedical Research**

PREVALENCE OF THROMBOPHILIA AND THROMBOTIC EVENTS IN PATIENTS WITH FABRY DISEASE IN A REFERENCE CENTER FOR LYSOSOMAL DISORDERS IN SOUTHERN BRAZIL

Jéssica Dick^{a,b}, Sandra Leistner-Segal^{a,b}, Filippo Pinto e Vairo^{a,b}, Ida Vanessa
Doederlein Schwartz^{a,c}.

^a Basic Research and Advanced Investigations in Neurology, Experimental Research Centre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos 2350, 3rd floor. CEP: 90035-903. Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brazil;

^b Medical Genetics Service, HCPA. Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brazil;

^c Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43323M. CEP: 91501-970. Caixa Postal 15053. Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

Venous thromboembolism (VTE) is a multifactorial genetic disorder which occurs in approximately one in a thousand adults per year. Because there is no laboratory test or clinical marker useful for predicting which patients with Fabry disease may develop thrombotic events, this study was undertaken to determine whether there is a hereditary predisposition to hypercoagulation in these patients. Methodology: The prevalence of p.R506Q mutation in the Factor V gene and the c.G20210A mutation in Factor II gene (prothrombin) were evaluated in 39 patients with Fabry disease from Southern Brazil, and

associated with clinical findings. The DNA analysis was performed by real-time PCR on genomic DNA. Results: In this group of patients, the frequency of mutation in prothrombin was 1.28% while no patient showed mutation in the factor V; and there was no correlation with the incidence of thrombotic events. Conclusion: Hereditary thrombophilia due to p.R506Q and c.G20210A mutations does not seem to be related to thrombotic events in Fabry patients in our cohort, although studies in larger cohorts and the inclusion of additional factors may be required to determine if a correlation exists.

Keywords: Fabry disease, rs1799963, rs6025, stroke, thrombotic event, PCR real time.

Resumo

O tromboembolismo venoso (TEV) é uma desordem genética multifatorial, que ocorre em aproximadamente um em cada mil adultos por ano. Por fato de não existir nenhum teste de laboratório ou marcador clínico útil para predizer quais pacientes com a doença de Fabry podem desenvolver eventos trombóticos, este estudo foi realizado para determinar se existe uma predisposição hereditária para hipercoagulação nestes pacientes. Materiais e Métodos: A prevalência da mutação p.R506Q no gene do Fator V e da mutação c.G20210A no gene do fator II (protrombina) foram avaliados em 39 pacientes com doença de Fabry do Sul do Brasil, e associado com achados clínicos. A análise do DNA foi realizada por PCR em tempo real com o DNA genômico. Resultados: Neste grupo de pacientes, a frequência de mutação na protrombina foi de 1,28%, enquanto que nenhum paciente apresentou mutação no fator V; e não houve correlação com a incidência de eventos trombóticos. Conclusão: A trombofilia hereditária devido as mutações p.506Q e c.G20210A parece não estar relacionado a eventos trombóticos em doentes de Fabry em nossa coorte, embora estudos em coortes maiores e a inclusão de fatores adicionais podem ser necessárias para determinar se existe uma correlação .

Palavras-chave: doença de Fabry, rs1799963, rs6025, evento trombótico, PCR em tempo real.

Introduction

Venous thromboembolism (VTE) is due to a multifactorial disorder encompassing the interaction of genetic and/or acquired risk factors that affect proteins of the coagulation system. Among the genetic factors, mutations in the factor V and prothrombin genes are the two main causes of hereditary thrombosis^{1,2}. The p.R506Q mutation, also known as Factor V Leiden (FVL) refers to an alteration in factor V gene which could result in activated protein C (APC) resistance and subsequently the imbalance of hemostasis and thrombosis¹⁻⁴. The prothrombin c.G20210A mutation is a point mutation in the 3'-untranslated region of the factor II gene, which can increase the synthesis of prothrombin thereby increasing its concentration^{5,7}. Numerous studies have shown that these two genetic mutations, alone or in combination with other risk factors may increase the occurrence or recurrence of VTE.

Fabry disease is an X-linked disorder of glycosphingolipids that is caused by mutations in *GLA* gene which leads to a deficiency of α -galactosidase A (EC 3.2.1.22) and it is associated with dysfunction of many cell types and includes a systemic vasculopathy. As a result, patients have a markedly increased risk of developing small-fiber peripheral neuropathy, stroke, myriad cardiac manifestations and chronic renal disease. Dysfunction of cerebrovascular circulation in Fabry disease has been shown in a number of studies using imaging end-points such as cerebral perfusion by positron emission tomography and arterial spin tagging using MRI⁷⁻⁹. Fabry disease has historically been considered rare, with an incidence of one in 40.000 to 117.000 male births¹³; however, a recent newborn screening study (which did not include female subjects) demonstrated that up to one in 3.100 boys are affected¹⁴. Virtually all complications of Fabry disease are non-specific in nature and clinically indistinguishable from similar abnormalities that occur in the context of more common disorders in the general population. However a high incidence of thrombotic accidents in Fabry's disease has been postulated^{11, 12}. We therefore focused our research on the analysis of mutations on coagulation factors which may also be involved with such consequences by changing the state of hemostasis⁶.

FVL heterozygosity is present in around one in 20 people, and thus the expected concurrence of FVL and Fabry disease is from 1:62.000 to 1:2.340.000 male patients. This combination is comparatively underreported in the literature with only two papers referring

to humans and a single mouse model examining FVL homozygosity concurrent with Fabry disease¹⁵⁻¹⁸. Each of these papers highlighted the considerable stroke risk associated with this genetic combination. One theoretical mechanism for this pathological association is through the accumulation of globotriaosylceramide (GL3) influencing the formation and function of antithrombotic lipid rafts, and by doing so altering the glycosphingolipid dependent inactivation of factor V by activated protein C (APC) which is an important regulatory protein that helps keep hemostasis. In patients with Fabry disease and FVL, this would lead to a decreased anticoagulant response to APC and an increased procoagulant state (compared to patients with FVL but without Fabry disease), leading to cerebral white matter lesions and stroke¹⁹. Prothrombin mutation was never associated to Fabry disease even though being one of the most frequent mutations predisposing to thrombophilia.

Methodology

The study was approved by the local Ethics Committee. The sample comprised 39 patients - 20 males and 19 females - with Fabry disease, from 18 families, with a mean age of 47.82 years. All the patients are followed at the Medical Genetics Service at Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil (HCPA-SGM), which is considered to be a Reference Center for Lysosomal Disorders in the State of Rio Grande do Sul. The clinical information was obtained by chart review.

DNA samples were extracted by the salting out technique and were kept frozen at the Molecular Genetics Laboratory. All were quantitated by spectrophotometer (NanoDrop®) and then diluted to a standard concentration of 20 ng/uL.

The genotyping protocol consisted of a TaqMan assay, which uses a pair of PCR primers and a TaqMan probe with minor groove binder (MGB) at the 3'end and fluorescent dye (FAM™ or VIC®) at the 5'end. The two different fluorescent dye probes are complementary either to the wild type or to the mutated allele. In order for the reaction to occur 6μL TaqMan Universal PCR Master Mix, 0.3μL the test DNA 1.0μL and 4.7μL of water are also required, thereby completing 12μL in every well in a 48 well plate. Negative, homozygous mutant, heterozygous and homozygous wild type standard controls were used in every assay in order to be used by the equipment software to cluster the different

genotype groups according to the thermo cycler results. Temperature cycles for *Real Time* PCR were the ones pre-established by the StepOnePlus™ software, with an extension temperature of 60 ° C.

FV assay (ID _ 11975250 rs6025) contains a p.R506Q mutation associated FAM probe, featuring the aminoacid glutamine (Q), while VIC probe corresponds to the normal aminoacid, arginine (R). The PT assay (ID _ 87266802-10 rs1799963) with a c.G20210A mutation in the VIC probe carries adenine (A) and FAM probe carries the codon with guanine (G).

Results

The allelic frequency of the c.G20210A mutation was found to be 1.28%, ie, only one individual heterozygous for this mutation (2.56%) and no homozygous mutant patients were identified. None of the patients were shown to be either heterozygous or homozygous for the factor V Leiden. The only patient who is heterozygous for c.G20210A mutation is a 48 years old female with the 30delG mutation in the *GLA* gene. At this moment, she is asymptomatic, in other words, had never experienced any thrombotic event.

Six patients (15.4%) had at least one thrombotic event as stroke or ischemic transient attack (Table 1). The average age of stroke was 53.5 years. From the five patients who had an episode of stroke, 60% were women. Hence, in this study 50% of thrombotic events occurred in female and 50% in male – 2 with stroke and one with TIA.

Table 1: Occurrence of thrombotic events in patients analyzed (n= 39)

Stroke	TIA	Total Thrombotic Events
5 (12.82%)	1 (2.56%)	6 (15.38%)

* (TIA) *Transient Ischemic Attack*

Discussion and Conclusion

Although hereditary thrombophilias are important causes of thrombotic events, they do not associate with an increased number of these events in our sample of patients with

Fabry disease. The only patient heterozygous for the mutation in *PT* gene did not develop any thrombotic event, while six other patients, even without the presence of hereditary thrombophilia in question developed stroke or TIA. The incidence of hereditary thrombophilia varies between different regions and populations but it is more common in Caucasians. The global prevalence of heterozygous for the mutation in *PT* gene is 2% on average (1.7 to 2.4%)²¹, while for the FV mutation (FVL) varies between 0.45 - 5.2 %²² therefore, we can consider that our findings are within or even below what is expected.

A published review of 388 patients with Fabry disease showed that 13% had suffered a stroke or transient ischemic attack¹². In our study, we found a similar percentage of events. The patients in our study had a stroke with a mean age of 53.5 years while this event in the general population is more common after age 55, showing that Fabry patients are at risk to present this complication at an early age. Studies in larger cohorts and the inclusion of additional factors may be required to determine if some correlation exists of Fabry disease with hereditary thrombophilia.

Footnotes

Competing interests: None to declare.

Patient consent: Patient consent was obtained for publication.

Acknowledgements

This study was supported by the Pro-BIC HCPA/CNPq Undergraduate Research Program, by the FAPERGS/HCPA Undergraduate Research Program, and by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research and Event Incentive Fund (FIPE/HCPA). The study sponsors had no involvement in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication.

References

1. Leiden mutation low prothrombin G20210A mutation prevalence in a healthy Moroccan population. *Thromb Haemost.* 2002; 88:1073-4.
2. Souza SS, Ferriani RA, Pontes AG, Zago MA, Franco RF. Factor V Leiden and factor II G20210A mutations in patient with recurrent abortion. *Human Reproduction.* 1999; 14(10):2448-50.
3. Dahlback B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb and Haemost.* 1995; 74(1):139-148.
4. Van Cott EM, Soderberg BL, Laposata M. Activated protein C resistance, the factor V Leiden mutation and a laboratory testing algorithm. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126: 577-582.
5. Zivelin A, Rosenberg N, Faier S, Kornbrot N, Peretz H, Mannhalter C. et al A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the gene. *Blood.* 1998; 92:1119-1124.
6. DeGraba T, Azhar S, Dignat-George F, Brown E, Boutiere B, Altarescu G, et al. Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients. *Ann Neurol.* 2000; 47:299-33.
7. Moore DF, Ye F, Brennan ML, Gupta S, Barshop BA, Steiner RD, et al. Ascorbate decreases Fabry cerebral hyperperfusion suggesting a reactive oxygen species abnormality: an arterial spin tagging study. *J Magn Reson Imaging.* 2004; 20(4): 674–683.
8. Moore DF, Altarescu G, Herscovitch P, Schiffmann R. Enzyme replacement reverses abnormal cerebrovascular responses in Fabry disease. *BMC Neurol.* 2002; 2(1): 4.
9. Hilz MJ, Kolodny EH, Brys M, Stemper B, Haendl T, Marthol H, et al. Reduced cerebral blood flow velocity and impaired cerebral autoregulation in patients with Fabry disease. *J Neurol.* 2004; 251(5): 564–570.

10. Schiffmann R. Fabry disease. Elsevier – Pharmacology & Therapeutics. 2009; 122:65-77.
11. Grewal RP. Stroke in Fabry's disease. Journal of Neural. 1994; 241:153.
12. Robert J, Desnick RJ, Ioannou YA, Christine ME. α -galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: David VMD, Henry JK, editors. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 7th ed. New York; 1995. p. 2741.
13. Mehta A, Ginsberg L. Natural history of the cerebrovascular complications of Fabry disease. Acta Paediatrica. 2005; 94:24-7.
14. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, et al. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. Am J Hum Genet – AJHG. 2006; 79:31-40.
15. Altarescu G, Moore DF, Schiffmann R. Effect of genetic modifiers on cerebral lesions in Fabry disease. Neurology. 2005; 64:2148-50
16. Shen Y, Bodary PF, Vargas FB, Homeister JW, Gordon D, Ostenson KA, et al. Alpha-galactosidase A deficiency leads to increased tissue fibrin deposition and thrombosis in mice homozygous for the factor V Leiden mutation. Stroke. 2006; 37:1106-8.
17. Mohrenschlager M, Pontz BF, Lanzl I, Podskarbi T, Henkel V, Ring J. Fabry disease: case report with emphasis on enzyme replacement therapy and possible future therapeutic options. J Dtsch Dermatol Ges – DTSCH. 2007; 5:594-7.
18. Hemelsoet DM, Vantilborgh A, De Bleecker JL, et al. Effect of genetic modifiers on cerebral lesions in Fabry disease. Neurology. 2006; 66:1311.
19. Albers GW, Caplan LR, Easton JC, Fayad PB, Mohr JP, Saver JL, et al. Transient ischemic stroke – Proposal for a new definition. N Engl J Med. 2002; 347:1713-6.
20. Buchan AM, Balami JS, Arba F. Stroke Prevention: treatment and rehabilitation. 1st ed. Spence JD, Barnett HJM, editors. New York: McGraw-Hill; 2012. p. 4-15.

21. Rosendaal FR, Doggen CJM, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscoick DS, Hillarp A, Watke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH, et al. Geographic Distribution of the 20210G to A Prothrombin Variant. *Schattauer*, 1998. 79:706-708.
22. Kujovich LJ. Review: Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med*. 2011; 13(1):1-16.

5. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

Formatado para submissão na **Clinical & Biomedical Research**

THROMBOEMBOLIC EVENTS IN GAUCHER DISEASE PATIENTS AND HETEROZYGOSITY FOR FACTOR V LEIDEN AND PROTHROMBIN MUTATION

*Alicia Dornelles Dornelles^a, *Jessica Dick^{a,b}, Sandra Leistner-Segal^{a,b}, Debora Bertholdo^a, Filippo Vairo^{a,b}, Ida Schwartz^{a,b,c}

**both authors have the same contribution to the paper*

^a Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos 2350, 3rd floor. CEP: 90035-903. Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brazil;

^b Basic Research and Advanced Investigations in Neurology, Experimental Research Centre, HCPA. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

^c Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43323M. CEP: 91501-970. Caixa Postal 15053. Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

Splenectomized patients with Gaucher Disease (GD) seem to have higher risk of developing avascular necrosis (AVN). Besides that, the presence of Factor V Leiden mutation (FVL) and prothrombin mutation (PT) are associated with an increased risk of ischemic events in young adults. This study evaluated the individual genetic makeup of patients with DG relating with the influence of these hereditary thrombophilias. We report 2 Type I GD patients (a 35yo male and a 30yo female) who are heterozygous for FVL and PT mutation. A 35-year-old male patient splenectomised, with AVN of femoral head, history of blurred vision and weakness in both hands (diagnosed as Transient Ischemic Attack). The female patient splenectomised and heterozygous for c.G20210A (PT mutation), 30 years old, had AVN on right femoral head and thrombocytopenia. Although thrombocytopenia indicates against the use of anti-platelet agents, this concept should be reassessed in patients who have mutation predisposing to thromboembolic events.

Keywords: Gaucher disease; rs6025; rs1799963; AVN.

Resumo

Pacientes esplenectomizados com Doença de Gaucher (DG) parecem ter maior risco de desenvolver necrose avascular (NAV). Além disso, a presença da mutação no Fator V de Leiden (FVL) e a mutação da protrombina (PT) estão associadas com um risco aumentado de eventos isquêmicos em adultos jovens. Este estudo avaliou a composição genética individual de pacientes com DG relacionando com a influência destas trombofilias hereditárias. Nós relatamos dois pacientes com DG do Tipo I (homem, 35 anos; mulher, 30 anos), que são heterozigotos para a mutação do FVL e PT. Um paciente do sexo masculino, 35 anos de idade, esplenectomizado, com AVN de cabeça femoral, histórica de visão turva e fraqueza em ambas as mãos (diagnosticada como ataque isquêmico transitório). O paciente do sexo feminino, 30 anos de idade, esplenectomizado e heterozigotos para c.G20210A (mutação PT), teve NAV na cabeça do fêmur direito e trombocitopenia. Embora trombocitopenia tenha contraindicação para o uso de agentes antiplaquetários, este conceito deve ser reavaliada em doentes com a mutação que predispõe a eventos tromboembólicos.

Palavras-chave: doença de Gaucher; rs6025; rs1799963; NAV.

Background

Gaucher disease (GD) is the most common lysosomal storage disorder, with an estimated worldwide incidence of 1 per 57,000 live births in the general population¹. It is caused by mutations in both alleles of the *GBA* gene, which codes for the enzyme lysosomal acid β -glucosidase (glucocerebrosidase), which catalyses the hydrolysis of glucocerebroside into glucose and ceramide². Consequently, glucocerebroside builds up within macrophages, particularly in the spleen, liver, bone marrow, and lungs. Therefore, GD is a multisystem disorder and exhibits phenotypic heterogeneity. Disease severity ranges from a lethal perinatal form to asymptomatic illness in adulthood. GD type I (MIM #230800) is the most prevalent form and differs from other forms by a lack of central nervous system involvement. Clinical and radiological evidence of skeletal involvement occurs in the majority of patients.

Before enzyme replacement therapy (ERT) became available, total splenectomy was commonly used to manage severe hypersplenism. It has been documented, however, that splenectomized patients are at a greater risk to develop AVN [Ashkenazi et al.,1986; Zimran et al., 1995]. Since the 1990s, enzyme replacement therapy (ERT) has been the treatment of choice for GD. ERT has improved quality of life among GD patients by reversing many signs and symptoms^{3,4}. However, the amount of enzyme required to maintain quality of life and reverse the course of symptoms is controversial. While ERT is highly effective in reversing visceral and haematological manifestations, its precise impact on the bone disease is unknown. There are three similar recombinant enzymes in terms of efficacy⁵ available for the treatment of GD: imiglucerase (Genzyme Corporation, Allston, MA), velaglucerase alfa (Shire HGT, Dublin, Ireland), and taliglucerase alfa (Protalix, Carmiel, Israel).

Inherited thrombophilia is a genetic tendency to venous thromboembolism (VTE) and a hereditary or acquired cause, or both can now be identified in over 80% of these cases (Whitlach et al., 2008). Factor V Leiden is the most prevalent inheritable risk factor for VTE, accounting for 40 to 50 percent of cases. The prothrombin gene mutation (p.G20210A), protein S and protein C and antithrombin deficiencies account for most of the remaining cases.^{7,8} The Factor V Leiden (FVL) mutation (p.R506Q) and c.G20210A are associated to an increase on the risk of thromboembolic events^{6,9,10}. Heterozygosity for the factor V Leiden

mutation accounts for 90 to 95 percent of cases of the hereditary APC resistance and the prevalence of heterozygosity for the factor V Leiden mutation in Caucasians ranges from 1 to 8.5 percent^{11,12}. The absolute incidence of VTE in patients with FVL ranges from 0.19% to 0.45% per year, compared to 0.10% in an individual without the mutation, and heterozygous can be identified in approximately 15-20% of VTE patients (Favarolo et al., 2012). Heterozygous carriers for PG20210A have 30 percent higher plasma prothrombin levels than normals.¹³

The presence of these mutations in homo or heterozygosis may also increase the risk in developing AVN in patients with GD, and the risk may be even higher if associated with splenectomy⁶.

For genotyping of PT and FVL mutations, DNA samples were extracted by the salting out technique and were kept frozen at the Molecular Genetics Laboratory. All were quantitated by spectrophotometer (NanoDrop®) and then diluted to a standard concentration of 20 ng/μL. The genotyping protocol consisted of a TaqMan assay, which uses a pair of PCR primers and a TaqMan probe with non-flourescent quencher (NFQ) at the 3'end and flourescent dye (FAM™ or VIC®) at the 5'end. The two different flourescent dye probes are complementary either to the wild type or to the mutated allele. In order for the reaction to occur 6μL TaqMan Universal PCR Master Mix, 0.3μL the test DNA 1.0μL and 4.7μL of water are also required, thereby completing 12μL in every well in a 48 well plate. Negative, homozygous mutant, heterozygous and homozygous wild type standard controls were used in every assay in order to be used by the equipment software to cluster the different genotype groups according to the thermo cycler results. Temperature cycles for *Real Time* PCR were the ones pre-established by the StepOnePlus™ software, with an extension temperature of 60 ° C. FV assay (ID _ 11975250 rs6025) contains a p.R506Q mutation associated FAM probe, featuring the aminoacid glutamine (Q), while VIC probe corresponds to the normal aminoacid, arginine (R). The PT assay (ID _ 87266802-10 rs1799963) with a c.G20210A mutation in the VIC probe carries adenine (A) and FAM probe carries the codon with guanine. From 42 GD patients from our center, 5 developed AVN, one is heterozygous for PT and one is heterozygous for FVL mutation. Although noting that the absence of these mutations does not exclude the possibility of thrombosis.

In the 42 DNA samples from patients who had been diagnosed with GD at HCPA, five (11.9%) were heterozygous for the p.R506Q mutation (FVL), generating an allelic frequency of 5.95%. Analysis of the Real Time PCR also showed one heterozygous for the c.G20210A mutation (PT), thus presenting a prevalence of 2.38% and allelic frequency of 1.19% (Supplementary Table 1). Thrombotic events were verified in 11,9% genotyped patients, even if they have not been identified with mutations analyzed. Among five patients with AVN, four of them were also splenectomized.

Prevalence G20210A	Prevalence R506Q	Thrombotic Event	Splenectomized
1 (2,381%)	5 (11,9%)	5 (11,9%)	8 (19,05%)
G20210A + AVN 1 (2,38%)		R506Q + AVN 1 (2,38%)	

Table 1: the prevalence of heterozygote patients for a mutation in the PT gene was less than the FVL mutation. Among the five patients who had AVN, two of them had some hereditary thrombophilia. Some patients have the thrombophilic mutations but did not develop AVN. In the group of 42 patients, eight had been splenectomized.

This report describes the case of two patients with GD type I who have developed AVN previously to ERT treatment and are heterozygous for mutations known to increase the risk of thromboembolic events.

Case Presentation

Patient 1

A 34 year-old male patient with GD type I (p.N370S/L444P) who is heterozygous for factor V Leiden (FVL) mutation (p.R506Q), blood type O+. His symptoms started when he was 16 years old, with bone pain, fatigue, hepatosplenomegaly and bone changes. Regarding family history, he is the 5th sibling of a non consanguineous couple. He has 2 brothers with GD type I and 2 cousins with GD type III. He has a healthy daughter.

Patient 2

A 30 year-old female patient with GD type I (p.N370S/L444P) who is heterozygous for PG20210A, blood type A+. Her symptoms started when she was 22 years old, with bone pain, hepatosplenomegaly, pancytopenia and bone changes. One year before diagnosis, she

developed AVN on right femoral head, which remained undiagnosed until investigations for GD started. Regarding family history, she has a sister with GD type I without important bone changes. She has a healthy son.

Investigations

In 2001, the male patient underwent to a splenectomy by the age of 25. The bone marrow aspiration done at that time showed Gaucher cells but the diagnosis was made just in 2003, 1 year after an episode of osteomyelitis in left tibia and AVN on right femoral head. By that time (2002), with 26 years old and before starting ERT, he has been hospitalized because of important pain on right leg and lumbar column, with no relief besides the use of morphine. The MRI showed “generalised sign reduction on the level of T1 e T2; femoral neck with increased sign (failure of bone phenomenon); articular effusion coxofemoral right”, is compatible with NAV of femoral head. He was then referred to our Hospital and diagnosed with GD by biochemical (beta-glucosidase in leucocytes=1.1 nmoles/h/mg protein) and molecular analysis.

Patient 2 was diagnosed at 26 years-old by enzymatic and molecular analysis (enzymatic activity in leucocytes: 0.35 nmoles/h/mg protein). Her MRI from right and left legs showed: R= changes bone marrow signal intensity of the femur; L= intensity changes in bone marrow, more diffuse compared to the contralateral femur; MRI knee R - changes in bone marrow distal femur, proximal tibia and the patella inferomedial region.

Treatment

In april/2004, ERT with imiglucerase was initiated for patient 1 at the dose of 30 U/kg/infusion. After 1 year of treatment, and because of good response to therapy, his dose was reduced to 15 U/kg/infusion. Due to the return of bone pain, his dose was increased to 20 U/kg/infusion in February/2007, and total hip arthroplasty was performed in 2008. His dose was reduced again in February/2011 to 15 U/kg/infusion, which is his current dose. No other medication is used.

Patient 2 started ERT in 2009 (when she was 27 years old), at the dose of 45 U/kg/infusion. After 7 months on treatment, because of good response, her dose was

reduced to 30 U/kg/infusion and in 2011 to 20 UI/kg/inf., total hip arthroplasty was performed in 2011. She also is using oral contraceptive and is being treated for osteoporosis with alendronate 70mg/week.

Outcome and Follow-Up

Patient 1

In 2010, 3 years after dose reduction to 20 U/kg/infusion, he presented blurred vision and weakness of both hands and was diagnosed as transient ischemic attack. MRI showed small vessel disease (Figure 1), which stayed stable on follow-up MRI two years later. No other risk factor for stroke is present. He is on irregular use of aspirin 100mg/day since then. In his last evaluation he presented lumbar spine osteopenia, no cytopenia, homocysteine of 6.1 (normal range), Severity Score Index (SSI)¹⁴ of 3, no hepatomegaly.

Patient 2

In her last evaluation she presented painful hepatomegaly on palpation (7.5cm below the left costal border), no splenomegaly, no anaemia (haemoglobin: 11.7g/dL), normal platelets count (155000/microL), lumbar spine osteoporosis, homocysteine of 6.3 (normal range), SSI of 2, lumbar and ribs pain, without need of pain killers to relief, menometrorrhagia. In 2013 her brain MRI was normal."

Discussion

Two young adult patients, with mutations that increase the risk of development of thromboembolic events, actually developed this manifestation. The prevalence of these mutations in our centre is similar to described on literature^{6,15}. There is only one study about the association between hereditary thrombophilia and Gaucher disease and there is no evidence about the association between GD and ischemic stroke. According to this study⁶, the development of AVN in Gaucher disease is primarily due to Gaucher cell infiltration, but the compounding effect of heterozygosity for several mutations of genes related to thrombophilia could not be evaluated. This study also points out that splenectomy can also be associated with increased risk for those events as described previously.^{6,16,17}

The 2011 AHA/ASA guidelines recommend that patients with ischemic stroke or TIA who have an established inherited thrombophilia should be evaluated for deep vein thrombosis, and anticoagulation therapy should be started.¹⁸ In the absence of venous thrombosis, either anticoagulation or antiplatelet therapy is considered reasonable. For patients with an inherited thrombophilia and a history of spontaneous cerebral venous thrombosis or recurrent thrombotic events, the guidelines note that long-term anticoagulation is probably indicated.

Having a non-O blood group (eg, A, B, or AB) appears to increase the risk of developing VTE in both heterozygotes and homozygotes for factor V Leiden by two- to four-fold.^{19, 20, 21} The patient who developed AIT was O+, but patient 2 is A+, adding risk for developing another thromboembolic event.

Antithrombotic therapy is usually not recommended for asymptomatic carriers of FVL or PG20210A, neither for GD patients presenting AVN. Our cases emphasize that GD patients who are carriers of an inherited thrombophilia may be at higher risk to develop not only AVN, but also other types of thromboembolic events; so, the use of antithrombotic therapy should be considered in these patients.

Thrombocytopenia is a relative contraindication of use of anti-platelets, but its use can be beneficial for patients with GD and mutations that predispose to thromboembolic events. Knowledge of thrombophilia status to indicate pre-surgical prophylaxis for VTE, and for female patients - pre-natal. Although the indication for prophylaxis before surgery remains controversial^{22, 23}.

The use of oral contraceptives (OC), especially third generation OCs, has been associated with acquired APC resistance, as well as use of hormone replacement therapy²⁴. APC resistance may underlie, in part, the supra-additive effect of exogenous estrogens on thrombotic risk in women with factor V Leiden²⁵. The use of oral contraceptives alone is a strong risk factor for CVT, and the addition of oral contraceptives to the presence of factor V Leiden results in a risk that exceeds the sum of the two separate risks: Factor V Leiden heterozygotes — 1 in 1667; Factor V Leiden heterozygotes taking OCs — 1 in 345.

The prothrombin gene mutation may also increase the risk of venous thrombosis in patients with acquired risk factors, such as pregnancy and the relation between stroke and

c.G20210A has been clearly reported. Concerning to genetic thrombophilias and the stroke risk²⁸, two or more mutations increase the OR for stroke from 2.6-3.7 (prothrombin gene mutation and Factor V Leiden mutation) to 18.6.

The 2011 AHA/ASA guidelines recommend that patients with ischemic stroke or TIA who have an established inherited thrombophilia should be evaluated for deep vein thrombosis, which is an indication for short- or long-term anticoagulation, depending on the clinical and hematologic circumstances¹⁸. In the absence of venous thrombosis, either anticoagulation or antiplatelet therapy is considered reasonable. For patients with an inherited thrombophilia and a history of spontaneous cerebral venous thrombosis or recurrent thrombotic events, the guidelines note that long-term anticoagulation is probably indicated.

Footnotes

Competing interests: None.

Patient consent: Patient consent was obtained for publication.

Acknowledgements

This study was supported by the Pro-BIC HCPA/CNPq Undergraduate Research Program, by the FAPERGS/HCPA Undergraduate Research Program, and by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research and Event Incentive Fund (FIPE/HCPA). The study sponsors had no involvement in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication.

References

1. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1999;281:249-54.
2. Beutler E. Gaucher disease: multiple lessons from a single gene disorder. *Acta Paediatr Suppl* 2006;95:103-9.
3. Mistry PK, Sadan S, Yang R, Yee J, Yang M. Consequences of diagnostic delays in type 1 Gaucher disease: the need for greater awareness among hematologists/oncologists and an opportunity for early diagnosis and intervention. *American journal of hematology* 2007;82:697-701.
4. Hollak CE, de Fost M, van Dussen L, Vom Dahl S, Aerts JM. Enzyme therapy for the treatment of type 1 Gaucher disease: clinical outcomes and dose – response relationships. *Expert opinion on pharmacotherapy* 2009;10:2641-52.
5. Elstein D. Recent advances in treatment approaches to Gaucher disease. *Current pharmaceutical biotechnology* 2011;12:854-60.
6. Elstein D, Renbaum P, Levy-Lahad E, Zimran A. Incidence of thrombophilia in patients with Gaucher disease. *Am J Med Genet.* 2000 Dec 18;95(5):429-31.
7. Mateo J, Oliver A, Borrell M, et al. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism--results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost* 1997; 77:444.
8. Margaglione M, Brancaccio V, Giuliani N, et al. Increased risk for venous thrombosis in carriers of the prothrombin G-->A20210 gene variant. *Ann Intern Med* 1998; 129:89.
9. Kim R, Becker R. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: A meta-analysis of published studies. *American Heart Journal.* 2003; 146 (6).
10. Kahn, M. Hypercoagulability as Cause of Adult Stroke. *Southern Medical Journal.* Volume 96, Number 4, April 2003.

11. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346:1133.
12. Lee DH, Henderson PA, Blajchman MA. Prevalence of factor V Leiden in a Canadian blood donor population. *CMAJ* 1996; 155:285
13. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88:3698.
14. Zimran A, et al. Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1992; 71:337–353.
15. Martínez-Martínez M, Cazorla-García R, Rodríguez de Antonio LA, Martínez-Sánchez P, Fuentes B, Díez-Tejedor E. Hypercoagulability and ischemic stroke in young patients. *Neurología*. 2010;25(6):343-348.
16. Ashkenazi A, Zaizov R, Matoth Y. 1986. Effect of splenectomy on destructive bone changes in children with chronic (Type I) Gaucher disease. *Eur J Pediatr* 145:138–141.
17. Zimran A, Elstein D, Schiffman R, Abrahamov A, Goldberg M, Bar-Maor JA, Brady RO, Guzzetta PC, Barton NW. 1995. Outcome of partial splenectomy in type I Gaucher disease. *J Pediatrics* 126:596–597.
18. Furie KL, Kasner SE, Adams RJ, et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke* 2011; 42:227.
19. Robert A, Aillaud MF, Eschwège V, et al. ABO blood group and risk of venous thrombosis in heterozygous carriers of factor V Leiden. *Thromb Haemost* 2000; 83:630.
20. Morelli VM, De Visser MC, Vos HL, et al. ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden. *J Thromb Haemost* 2005; 3:183.

21. Procare-GEHT Group. ABO blood group but not haemostasis genetic polymorphisms significantly influence thrombotic risk: a study of 180 homozygotes for the Factor V Leiden mutation. *Br J Haematol* 2006; 135:697.
22. Ryan DH, Crowther MA, Ginsberg JS, Francis CW. Relation of factor V Leiden genotype to risk for acute deep venous thrombosis after joint replacement surgery. *Ann Intern Med* 1998; 128:270.
23. Lindahl TL, Lundahl TH, Nilsson L, Andersson CA. APC-resistance is a risk factor for postoperative thromboembolism in elective replacement of the hip or knee--a prospective study. *Thromb Haemost* 1999; 81:18.
24. Post MS, Rosing J, Van Der Mooren MJ, et al. Increased resistance to activated protein C after short-term oral hormone replacement therapy in healthy post-menopausal women. *Br J Haematol* 2002; 119:1017.
25. Legnani C, Cini M, Cosmi B, et al. Oral contraceptive use in women with poor anticoagulant response to activated protein C but not carrying the factor V Leiden mutation increases the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2004; 91:712.
26. De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, et al. Prothrombin G20210A mutant genotype is a risk factor for cerebrovascular ischemic disease in young patients. *Blood* 1998; 91:3562.
27. Lalouschek W, Schillinger M, Hsieh K, et al. Matched case-control study on factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack up to the age of 60 years. *Stroke* 2005; 36:1405.
28. Kenet G, Lütkehoff LK, Albisetti M, et al. Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in neonates and children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Circulation* 2010; 121:1838.

FIGURES

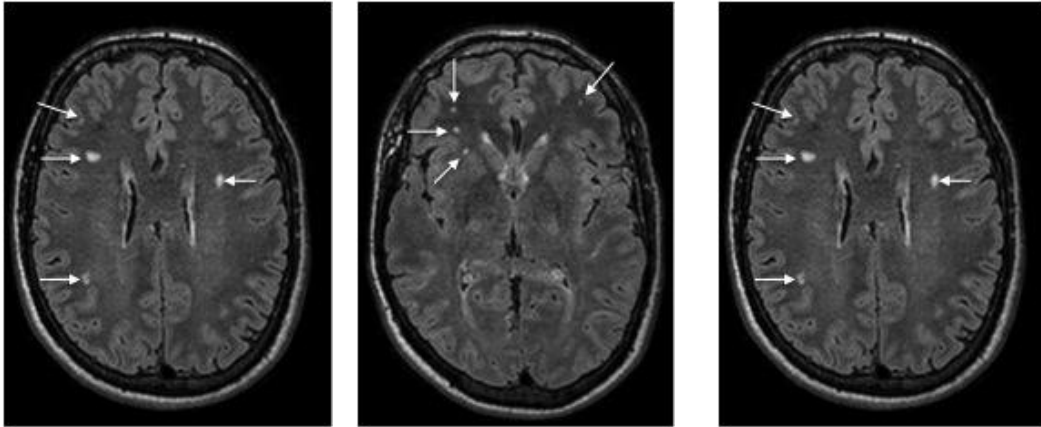


Figure 1: Brain MRI shows small vessel disease. Axial reconstructions of 3D fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) demonstrate diffuse hyperintense foci on deep and subcortical white matter (arrows). Although nonspecific, this finding suggests small vessel disease.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

Considerando os resultados encontrados no presente estudo, podemos concluir que:

a) A presença de mutações em genes relacionados à trombofilias hereditárias não significa, inexoravelmente, a ocorrência de fenômenos tromboembólicos. Alguns indivíduos, mesmo que heterozigotos para as mutações, não desenvolveram qualquer tipo de tromboembolismo.

b) Nenhum indivíduo homozigoto foi encontrado, nem para a mutação no gene do fator V, nem para a mutação do gene de protrombina. Resultado esperado visto que, essas mutações raramente aparecem em homozigose – 1 em 5.000 indivíduos para FVL, sendo a mutação de protrombina ainda mais rara.

c) A ausência das mutações descritas (mesmo elas estando entre as principais na literatura) não exclui a possibilidade de ocorrência de eventos tromboembólicos.

d) O presente estudo constatou também, uma maior frequência da mutação do Fator V de Leiden quando comparado com a mutação no gene de Protrombina, conforme dados da literatura, mesmo que a população analisada relativamente pequena.

e) A presença de qualquer um dos fatores de trombofilia analisados, e que podem ser fatores de risco para eventos trombóticos, não são mais comuns em pacientes com doença de Fabry, que desenvolveram AVC ou ataque isquêmico transitório (AIT).

f) A presença das trombofilias associada à doença de Gaucher pode ter associação com a necrose avascular (AVN) ocorrida nestes pacientes. Ou seja, nem todo indivíduo que possui DG irá ter ocorrência de AVN, entretanto se associado à alguma trombofilia a chance de desenvolver esse evento pode ser aumentada.

g) Analisando o perfil dos pacientes com doença de Gaucher, notou-se que a esplenectomia pode estar bastante relacionada com a ocorrência de AVN, conforme já estabelecido na literatura.

h) Deve-se considerar a relação existente entre a presença das trombofilias e a ocorrência de eventos trombóticos, sendo assim o diagnóstico precoce destas mutações possibilita a identificação de portadores assintomáticos que poderão receber orientação adequada em situações de risco, como no caso destas doenças lisossomais em questão, visando evitar a ocorrência ou recorrência das tromboembolias.

I) Que este estudo possa contribuir à comunidade acadêmica atuante na área da saúde e que possa trazer algum benefício futuro aos pacientes com estas doenças raras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altarescu G., Schiffmann R., Parker C.C., Moore D.F., Kreps C., Brady R.O., Barton N.W., *et al.* (2000). Comparative efficacy of dose regimens in enzyme replacement therapy of Type I Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis.*, v. 26, n. 4, p. 285-290.

Araujo A.P.Q.C. (2004). Psychiatric features of metabolic disorders. *Revista de Psiquiatria Clínica*, São Paulo, v. 31, n. 6, p.285-289.

Barranger J.A., O'Rourke E. (2001). Lessons learned from the development of enzyme therapy for Gaucher disease. *J Inherit Metab. Dis.*, v. 24, n. 2 supplement, p. 89-96, 2001

Bertina R.M. (2001). Genetic approach to thrombophilia. *Thromband Haemost*, v. 86, n. 1, p. 92-103.

Boggio P., Luna P.C., Abad M.E., Larralde M., *et al.* (2009). Doença de Fabry. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, vol.84 n.4.,1806-4841.

Böhm P., Kunz W., Horny H.P., Einsele H., *et al.* (2001). Adult Gaucher disease in association with primary malignant bone tumors. *Cancer*, v. 91, p. 457-462.

Bozzini C. E. & Molinas F. (2004). Hemostasia. *In: Houssay A.B., Cirgolani H.E. – Fisiologia Humana de Houssay*, Artmed, Porto Alegre, 7th ed.

Branton M.H., Schiffmann R., Sabnis S.G., Murray G.J., Quirk J.M., Altarescu G., *et al.* (2002). Natural history of Fabry renal disease: influence of alpha-galactosidase A activity and genetic mutations on clinical course. *Medicine* (Baltimore), v. 81, p. 122-138.

Charrow J., Esplin J.A., Gribble T.J., Kaplan P., Kolodny E.H., Pastores G.M., *et al.* (1998). Gaucher Disease: recommendations on Diagnosis, Evaluation, and monitoring. *Arch Intern Med*, v. 158, n. 14, p. 1.754-1.760.

Charrow J., Andersson H.C., Kaplan P., Kolodny E.H., Mistry P., Pastores G., *et al.* (2004). Enzyme replacement therapy and monitoring for children with type 1 Gaucher disease: consensus recommendations. *J Pediatr*, v. 144, p. 112-120.

Choudhury S., Meehan S., Shin H.T., *et al.* (2005). Fabry disease: an atypical presentation. *Pediatric Dermatology*. v. 22, n. 4, p. 334-337.

Contran R.S. & Mitchel R.N. (2000). Distúrios hemodinâmicos, trombose e choque. In Cotran R.S., Kumar V. & Collins T. Robbins: *Patologia Estrutural e Funcional*, 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Cox T.M.. (2001). Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. *J Inherit Metab. Dis.*, v. 24 (Suppl. 2), p. 106-112.

Dahlbäck B., Carlsson M., Svensson P., *et al.* (1993). Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated C. *Medical Sciences*, v. 90, p. 1004-1008.

Desnick R.J., Joannou Y. α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease: nature of the accumulated glycosphingolipids. In: Scriver C.H., Beaudet A., Valle D., editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. McGraw-Hill, 2001, New York, NY. p.3742-3.

Elstein D., Abrahamow A., Hadas-Halpern I., Zimran A, *et al.* (2001). Gaucher's disease. *The Lancet*. v.358, p.324-327.

Franco R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *In: Simpósio Hemostasia e Trombose. Medicina*, 2001, Ribeirão Preto, v. 34, n. 1, p. 229-237.

Franco R.F. Trombofilias hereditárias. *In: Simpósio Hemostasia e Trombose. Medicina*, 2001, Ribeirão Preto, v. 34, n. 3, p.248-257.

Grabowski G.A. Lysosomal storage diseases. *In: Braunwald E., Fauci A.S., editors. Harrison's Principles of Internal Medicine*, 1995. McGraw-Hill, 15th ed. Nova York, NY. p. 103-136.

Grabowski G.A., Leslie N., Wenstrup R., *et al.* (1998). Enzyme therapy for Gaucher disease: the first 5 years. *Blood Rev*, v. 12, n. 2, p. 115-133.

Grabowski G.A. (2008). Phenotype, diagnosis and treatment of Gaucher's disease. *The Lancet*. v. 372, p. 1263-1271.

Guyton A.C. & Hall J. E. (2002). Tratado de Fisiologia Médica, 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Herkenhoff M.E., Gaulke R., Souza J.G., Thomé N.S., Pitlovanciv A.K., Remualdo V.R., *et al.* (2012). Análise da mutação G20210A no gene da protrombina (fator II) em pacientes com suspeita de trombofilia no sul do Brasil. *J Bras Patol Med Lab*, v. 48, n. 2, p. 85-89.

Hira B., Pegoraro R.J., Rom L., Moodley J., *et al.* (2003). Absence of Factor V Leiden, thrombomodulin and prothrombin gene variants in Black South African women with pre-eclampsia and eclampsia. *BJOG*, v. 110, n. 3, p.327-238.

Junqueira L.C. & Carneiro J. (1999). Histologia Básica, 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Krawczak M., Ball E.V., Fenton I., Stenson P.D., Abeyasinghe S., Thomas N., Cooper D.N., *et al.* (2000). Human gene mutation database-a biomedical information and research resource. *Hum Mutat.*, v. 15, p. 45-51.

Larralde M., Boggio P., Amartino H., Chamoles N., *et al.* (2004). Fabry disease: a study of 6 hemizygous men and 5 heterozygous women with emphasis on dermatologic manifestations. *Arch Dermatol*, v. 140, p. 1440-1446.

Larralde M., Luna P. Fabry disease. In: Wolff K., Goldsmith L.A., Katz S.I., Gilchrest B.A., Paller A., Leffell D.J., editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. McGraw-Hill, 2007, New York. p.1281-1288.

MacDermot K.D., Holmes A., Miners A.H., *et al.* (2001). Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *J Med Genet.*, v. 38, p. 769-775.

Martins A.M., *et al.* (1999). Inborn Errors of Metabolism: a clinical overview. *São Paulo Medical Journal/Rev Paul Med*, v. 117, n. 6, p. 251-265.

Masson C., Cissé I., Simon V., Insalaco P., Audran M., *et al.* (2004). Fabry disease: a review. *Joint Bone Spine*. v. 71, p. 381-383.

Mendonça V.F., Paula M.T.M., Boasquevisque E.M., *et al.* (2001). Skeletal manifestations in Gaucher's disease. *Radiol Bras*. v. 34, n. 3, p.151-154.

Mehta A., Ginsberg L., *et al.* (2005). Natural history of the cerebrovascular complications of Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl.*, v. 94, p. 24-27.

Meijers D.C., Tekelenburg W.L., Bouma B.N., *et al.* (2000). High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med*, v. 342, p. 696-701.

Milani C., Constantinou M., Berz D., *et al.* (2008). Left sided inferior vena cava duplication and venous thromboembolism: case report and review of literature. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 1, p. 24-27.

Nakao S., Kodama C., Takenaka T., Tanaka A., Yasumoto Y., Yoshida A., *et al.* (2003). Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney Int.*, v. 64, p. 801-807.

Norstrom E., Thorelli E., Dalbäck B., *et al.* (2002). Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Blood*, v. 100, p. 524-530.

Poort S.R., *et al.* (1996). A common genetic variation in the 3' untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood Journal*, v. 88, n. 10, p. 3698-3703.

Prietsch V., Baulny H.O., Saudubray J.M., *et al.* In: Emergency treatment. Fernandes J., Saudubray J.M., Van den Berghe G., Walters J.H., editors. Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment. *Heidelberg: Springer*, 4th ed, 2006. p. 73–78.

Rees D.C., Cox M., Clegg J.B., *et al.* (1995). World distribution of factor V Leiden. *Lancet*, v.346, p.1133-1134.

Rodak B.F. *Hematology: Clinical principles and applications*, 2nd ed. Missouri: W.B. Saunders Company, 2002, p. 835.

Rosendaal F.R., Doggen C.J.M., Zivelin A., Arruda V.R., Aiach M., Siscoick D.S., Hillarp A., Watke H.H., Bernardi F., Cumming A.M., Preston F.E., Reitsma P.H., *et al.* (1998). Geographic Distribution of the 20210G to A Prothrombin Variant. *Schattauer*, v. 79, p.706-708.

Sanseverino M.T.V., Wajner M., Giugliani R., *et al.* (2000). Aplicação de um protocolo clínico-laboratorial para identificação de erros inatos do metabolismo em crianças gravemente enfermas. *Journal of Pediatrics*, v. 76, n. 5, p. 375-382.

Scriver C.R. Foreword. *In: Blau N., Duran M., Blaskovics M.E. Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. 3rd ed. Great Britain, 1996.

Souza I.N.C. *Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento* (Dissertação). Universidade Federal de São Paulo: Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 2002.

Swenson M.J. (1996). Circulação sanguínea e sistema cardiovascular. *In: Swenson M.J. & Reece W.O. Fisiologia dos Animais Domésticos*, 11th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Verrastro T. Hemostasia. *In: Aires M.M. Fisiologia*, 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

Von Scheidt W., Fitzmaurice T.F., Erdmann E., Hübner G., Olsen E.G., *et al.* (1991). An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. *N Engl J Med.*, v. 324, p. 395-399.

Wang R.Y., Lelis A., Mirocha J., Wilcox W.R., *et al.* (2007). Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. *Genet Med.*, v. 9, p. 34-45.

Werninghaus K., Raab R., Palko M., Bhawan J., *et al.* (1995). Punctate and linear angiectases: Anderson-Fabry disease (angiokeratoma corporis diffusum). *Arch Dermatol*, v. 131, p. 85-86.

Whybra C., Kampmann C., Willers I., Davies J., Winchester B., Kriegsmann J., *et al.* (2001). Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of disease in female heterozygotes. *J Inherit Metab Dis.*, v. 24, p. 715-724.

Zarate Y.A., Hopkin R.J., *et al.* (2008). Fabry's disease. *The Lancet.* v. 372. P. 1427-1435.

Zimran A., Altarescu G., Rudensky B., Abrahamov A., Elstein D., *et al.* (2005). Survey of hematological aspects of Gaucher disease. *The Lancet.* v.10, n. 2, p.151-156.

Zivelin A., *et al.* (1998). A single genetic origin for the common prothrotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood*, v. 92, n. 4, p. 1119-1124.

ANEXOS DO TRABALHO

Instructions for authors

Clin Biomed Res 2014

SCOPE AND POLICY

Clinical and Biomedical Research (CBR), formerly “Revista HCPA”, is a scientific publication from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and the School of Medicine of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). It is a free access scientific periodic that aims to publish papers from all relevant areas in the Health Sciences, including clinic and basic research. The selection criteria for publication include: originality, relevance of the theme, methodological quality, and adequacy to the journals’ editorial norms.

CBR supports the policies for the registration of clinical trials of the World Health Organization (WHO) [<http://www.who.int/ictcp/en/>] and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [<http://www.icmje.org/>]. Therefore, CBR will only accept clinical research articles that have received an identification number from the Brazilian Clinical Trials Registry (*Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos* - ReBEC) [<http://www.ensaioclinicos.gov.br>] or other official database dedicated to the registry of clinical trials.

All published articles are reviewed by anonymous peers. Once the article is accepted for publication, its copyrights are automatically transferred to the journal. The content of manuscripts submitted for publication to CBR implies that it has not been published previously and that it has not been submitted to another journal. To be published elsewhere, even in part, articles published in CBR require written approval of the editors. The concepts and declarations contained in the papers are the authors’ full responsibility. The articles may be written in Portuguese, English, or Spanish. The submissions in English are strongly encouraged by the editors.

The manuscript should fit into one of the different categories of articles published by the journal, as follows:

FORM AND PREPARATION OF ARTICLES

The following categories of contributions will be considered for publication

Editorial

Critical and thorough review, prepared at the invitation of the editors, and submitted by an author with renowned knowledge on the subject. Editorials can have up to 1,000 words. This section may include the Journal’s editorial of presentation, signed by the editor, besides special editorials that comprise requested collaborations about current themes or about articles published on the Journal.

Original Articles

Articles with unpublished research results, including full-length studies that contain all relevant information so that the reader may evaluate its results and conclusions, as well as replicate the research. Its formal structure should present the following topics: Introduction, Methods, Results and Discussion. The conclusions should be in the last paragraph of the Discussion, not requiring a specific section. Clinical implications and limitations of the study should be mentioned. For original articles, a structured abstract should be presented (Introduction, Methods, Results, and Conclusions) in Portuguese and English, in cases where the article is not written entirely in English. The Abstracts (Portuguese, Spanish, or English) should not exceed 250 words.

Articles submitted in this category should not exceed 3,000 words. Tables should be included together in the same manuscript file (after references) and figures should be submitted as an additional document in individual files.

Review Articles (written entirely in English)

Articles that aim to synthesize and critically evaluate the present knowledge on a particular theme. They should contain no more than 6,000 words. These articles should present an unstructured abstract, with no more than 200 words (except for systematic reviews – see abstract structure in ‘Original Articles’) and a comprehensive list, but preferably with no more than 80 references.

Tables should be included in the same manuscript file (after references) and the figures should be submitted as additional documents in individual files.

Case Reports (written entirely in English)

Articles based on peculiar cases and brief comments on the importance of the case in relation to the existing knowledge in the field. They should contain up to 1,000 words, with a total of no more than two tables or figures and 15 references, once presenting a literature review is not the purpose of the reports.

Their structure should present the following topics: Introduction, explaining the relevance of the case; Presentation of the case (Case Report), and Discussion. Case reports should describe novel or unusual findings, or offer new insights into a given problem. The content should be limited to facts relevant to the case. The confidentiality regarding patient identification is critical, so authors should not report any precise dates, initials, or any other information irrelevant to the case, but that may possibly identify the patient.

Case reports should have an unstructured abstract with no more than 150 words.

Tables should be included in the same manuscript file (after references) and figures should be sent as additional documents in individual files.

Case Reports: Images in Medicine (written entirely in English)

Section devoted to the publication of informative images, which are unusual and/or of broad interest in clinical situations. It should contain no more than 500 words and a total of 5 references. Two to three images (at a resolution of at least 300 dpi).

Letters

Opinions and comments on an article published in the Journal, on subjects of scientific relevance, and/or preliminary clinical observations. The text should be concise, with no more than 500 words. Only one table and one figure are allowed, and a maximum of five references. They should not have an abstract.

Special Articles

Manuscripts exclusively requested by the editors, on a subject of scientific relevance, to authors with recognized expertise in the area, and that do not meet the criteria for Editorials.

Supplements

In addition to regular issues, CBR publishes the supplement of the HCPA Science Week.

CONFLICTS OF INTEREST

Conflicts of interest arise when the author has financial or personal relationships that could inappropriately influence their professional judgment. These relationships may create favorable or unfavorable tendencies towards a paper and impair the objectivity of the analysis. Authors must disclose possible conflicts of interest.

This extends to editorials and review articles, and should be done at the time of submission of the manuscript.

It is at the editor's discretion to decide whether this information should be published or not and whether to use it for editorial decisions. A common form of conflict of interest is the funding of research by third parties who may be companies, government agencies, or others. This obligation to the funding entity may lead the researcher to obtain tendentious results, inappropriately influencing (bias) their work. Authors should describe the interference of the funding entity at any stage of the research, as well as the form of funding, and the type of relationship established between the sponsor and the author. The authors may choose to inform the peer reviewers' names for which their article should not be sent, justifying themselves.

PRIVACY AND CONFIDENTIALITY

Information and pictures of patients that allow their identification should only be published with formal written authorization of the patient, and only when necessary

for the purpose of the study. For formal authorization, the patient must know the content of the article and be aware that this article may be made available on the Internet. If in doubt about the possibility of identifying a patient, such as in the case of photos with stripes over the eyes, a formal authorization should be obtained. In the case of distortion of data to prevent identification, authors and editors should ensure that such distortions do not compromise the results of the study.

EXPERIENCES WITH HUMANS AND ANIMALS

All content related to research with humans and animals must have previous approval by the Research Ethics Committee or the Animal Ethics Committee, respectively. The works should be in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki (current or updated), the CNS Resolution n. 196/96 and its complementary regulations, as well as the Law n. 11.794/2008 for studies in animals. It is important to indicate the number of the project's registration in the respective Committee or Ethics Committee, as well as in the National Committee for Research Ethics, if applicable.

PREPARATION OF THE ARTICLE

The registration on the system and subsequent access or login are mandatory to submit and verify the status of submissions.

Identification: must include: a) Title of the article, which should be clear and concise. Do not use abbreviations.

There should be a version of the reduced title to appear in the header as well as a title in the English language; b) authors' full names; c) institution and the sector or unit of the institution to which each author is affiliated (personal titles and positions held should not be mentioned); d) name of the institution where the study was performed; e) indication of the corresponding author, accompanied by the electronic address; and f) if it has been presented at a scientific meeting, the name of the event, the place, and the date of completion should be indicated.

ALL NAMES OF ALL AUTHORS INCLUDED IN THE MANUSCRIPT SHOULD BE REGISTERED IN THE SYSTEM

Abstract and Keywords: The articles should have an abstract in Portuguese and English. Check the structure and the number of words described for each specific type of article (see above). The structured abstracts, required only for original articles, should present the name of the subdivisions that make up the formal structure of the article at the beginning of each paragraph (Introduction, Methods, Results and Conclusions). The keywords - expressions that represent the subject of the paper - should be in number from 3 to 10, provided by the author, based on the DeCS (Health Sciences Descriptors) published by Bireme, which is a translation from the

MeSH (Medical Subject Headings) from the National Library of Medicine, available in the following electronic address: <http://decs.bvs.br>.

The keywords should be presented in Portuguese and English.

Manuscript: it must conform to the structure required for each category of article. Text citations and references cited in the legends of tables and figures should be numbered consecutively in the order they appear in the text, with Arabic numerals. References should be cited in the text as in the example: Reference¹.

Tables: they should be numbered consecutively, with Arabic numerals, in the order they were cited in the text, and headed by a suitable title. They should be cited in the text, but duplicated information should be avoided. The tables, with titles and footnotes, should be self-explanatory. The abbreviations should be specified as footnotes without numerical indication. The remaining footnotes should be numbered in Arabic numerals and written in superscript.

Figures and charts: Illustrations (photographs, charts, drawings, etc.) should be sent in separate articles, in JPG format (at a high resolution – at least, 300 dpi). They should be numbered consecutively with Arabic numerals, in the other they are cited in the text and should be clear enough for reproduction and in the same language as the text. Photocopies will not be accepted. If there are figures extracted from other previously published studies, the authors should provide a written permission for their reproduction. This authorization shall accompany the manuscripts submitted for publication. The figures must have a title and subtitle (if necessary), which should both must precede the figure itself.

Abbreviations: abbreviations must be explained at first mention. On the rest of the article, it is not necessary to repeat the full name.

Name of medications: the generic name should be used.

In case of citing appliances/equipment: all appliances/equipment cited should include model, manufacturer's name, state, and country of manufacture.

Acknowledgements: should include the collaboration of people, groups, or institutions that have contributed to the study, but whose contributions do not justify their inclusion as authors; this item should also include the acknowledgements for financial support, technical assistance, etc. This item should come before the references.

Conflicts of interest: If there is any conflict of interest (see above), it should be declared. In case there is not, place in this section: "The authors declare no conflicts of interest" or "None to declare."

References: should be numbered consecutively, in the order in which they are mentioned in the text, and identified with Arabic numerals. The presentation must be based on a format called “Vancouver Style”, as the examples below, and the titles of journals should be abbreviated according to the style presented by the List of Journal Indexed in Index Medicus, from the National Library of Medicine, available at: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. The authors should ensure that the cited references in the text appear in the reference list with exact dates and authors’ names correctly spelt. The accuracy of references is the authors’ responsibility. Personal communications, unpublished or unfinished articles could be cited when absolutely necessary, but should not be included in the reference list and only cited in the text. The submission of the unpublished works mentioned in the manuscript may be requested at the discretion of the editors.

Examples of citing references:

Journal articles (from one to six authors)

Almeida OP. Autoria de artigos científicos: o que fazem os tais autores? Rev Bras Psiquiatr. 1998;20:113-6.

Journal articles (more than six authors)

Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Hilker S, Norwood K, Zink M, Windus D, et al. Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. N Engl J Med. 1986;315:157-61.

Articles without the author’s name

Cancer in South Africa [editorial]. S Afr Med J. 1994;84:15.

Books

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Chapters from a book

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

Books in which editors (organizers) are authors

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Theses

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly’s access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

Papers presented at conferences

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO

92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

Electronic Journal Articles

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]. Available from:
URL:<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Other types of reference should follow the document

International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Uniform Requirements for Manuscripts

Submitted to Biomedical Journals: Sample References

(http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Technical requirements

Microsoft Word document (.doc or .rtf), singled space, font size 10, 2-cm margins in each side, title page, abstract and descriptors, text, acknowledgements, references, tables and legends, and the figures should be sent in jpg or tiff at a resolution of at least 300 dpi.